

М.А. Хаснатинов ², С. Хавликова ⁵, Э. Таплин ³, М. Казимирова ⁴, Н. Гунавардани ¹, М. Словак ⁴,
Б. Клемпа ⁵, И.М. Джоунс ¹, М. Лабуда ⁵, Э.А. Гоулд ⁶, Т.С. Грицун ¹

РОЛЬ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ НЕВИРЕМИЧЕСКОЙ ТРАНСМИССИИ ВИРУСА МЕЖДУ КЛЕЩАМИ

¹ Школа биологических наук, Редингский Университет (Рединг, Великобритания)

² Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека (Иркутск)

³ Школа естественных наук, Уорикский университет (Ковентри, Великобритания)

⁴ Институт Зоологии (Братислава, Словакия)

⁵ Институт вирусологии (Братислава, Словакия)

⁶ Кафедра вирусологии политехнического университета (Марсель, Франция)

В настоящее время выделяют 3 субтипа вируса клещевого энцефалита (ВКЭ, род *Flavivirus*, сем. *Flaviviridae*): Западно-Европейский (ассоциирован с клещом *I. ricinus*), Сибирский и Дальневосточный (ассоциированы с таежным клещом *I. persulcatus*). Одним из основных путей циркуляции ВКЭ в природе является невинермическая трансмиссия вируса между зараженными и незараженными клещами во время совместного питания на одном прокормителе. Ранее было обнаружено, что эффективность невинермической трансмиссии между клещами *I. ricinus* типового штамма Западно-Европейского субтипа «Hypr» (Hypr) составляет 60 %, в то время как для типового штамма Сибирского субтипа «Васильченко» (Vs) — только 5 %. Для установления вирусных детерминант, определяющих эффективность трансмиссии мы создали ряд рекомбинантных вирусов с взаимозаменяемыми генами структурных (str) и неструктурных (ns) белков. Рекомбинантный вирус Hypr[str]Vs[ns] обладал 70 % эффективностью невинермической трансмиссии. Введение отдельных структурных генов штамма Hypr в инфекционный клон Vs также увеличивало эффективность трансмиссии до 33 %. Таким образом, нами показано, что эффективность невинермической трансмиссии ВКЭ определяется, прежде всего, свойствами структурных белков вируса.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, трансмиссия, рекомбинантный вирус

THE ROLE OF THE STRUCTURAL PROTEINS IN THE NON-VIRAEMIC TRANSMISSION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

М.А. Khasnatinov ², Sabina Havlikova ⁵, Andrew Tuplin ³, Maria Kazimirova ⁴,
Niluka Goonavardane ¹, Mirco Slovak ⁴, Boris Klempa ⁵, Ian M. Jones ¹, Milan Labuda ⁵,
Ernest A. Gould ⁶, Tamara S. Gritsun ¹

¹ School of Biological Sciences, University of Reading, UK

² Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

³ School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, UK

Institute of Zoology, Bratislava, Slovakia

⁵ Institute of Virology, Bratislava, Slovakia

⁶ Unit des Virus Emergents, Marseille, France

There are 3 subtypes of tick-borne encephalitis virus (TBEV) distinguished at present time: European (EU), Siberian (SIB) and Far Eastern (FE). The former one is associated with *Ixodes ricinus* tick, whereas the latter two — with *I. persulcatus*. The circulation of TBEV in nature is mediated by the non-viraemic transmission between infected and uninfected ticks co-feeding on the same hosts and it was shown that transmission rate of «Hypr» strain (EU subtype) is much higher than rate of «Vasilchenko» strain (SIB subtype) — 60 and 5 % respectively. To reveal the viral determinants of transmission efficacy, we constructed the series of recombinant viruses with gradually exchanged genes coding structural (str) and non-structural (ns) viral proteins. The recombinant virus Hypr[str]Vs[ns] achieved the rate of non-viraemic transmission of 70 %. The introduction of separate structural genes of Hypr into Vs infectious clone has enhanced the transmission efficacy as well, though not to such extent as entire structural region but up to 33 % only. Thus, it was shown that efficacy of non-viraemic transmission of TBEV depends from properties of viral structural proteins mainly.

Key words: tick-borne encephalitis virus, transmission, recombinant virus

Клещевой энцефалит (КЭ) — это инфекционное заболевание, распространенное в лесной и лесостепной зоне Северной Евразии. Возбудитель КЭ — вирус, который передается человеку при укусе иксодовых клещей. Ежегодно в мире происходит порядка 10000 новых случаев заболеваний КЭ [5]. ВКЭ относится к семейству *Flaviviridae* род *Flavivirus* и в настоящее время выделяют 3 субтипа вируса — Дальневосточный, Сибирский

и Западноевропейский. Основным переносчиком первых двух субтипов является таежный клещ *Ixodes persulcatus*, который распространен в лесной и лесостепной зоне Азии и Восточной Европы, вплоть до Прибалтики. Основной переносчик вирусов Европейского субтипа — клещ *Ixodes ricinus*, обитающий в лесах Западной и Восточной Европы до Урала [6]. Геном вируса состоит из одной одноцепочечной молекулы РНК длиной

~11000 нуклеотидных оснований (н.о.). Одна открытая рамка считывания кодирует полипротеин, который расщепляется клеточными сигналазами и вирусной протеазой NS3 на 3 структурных и 7 неструктурных белков. На поверхности вириона расположены 2 структурных белка — мембранный (М) и оболочечный (Е), которые вместе с липидной мембраной образуют оболочку вириона [9]. В природе ВКЭ существует в процессе непрерывной передачи (трансмиссии) от зараженных клещей к незараженным. Существует 3 основных вида трансмиссии: неvirемическая, при которой вирус передается незараженным клещам во время совместного питания в непосредственной близости с зараженным клещом [7], virемическая, при которой вирус передается клещу с кровью больного животного [1] и трансвариальная, при которой вирус передается от зараженной самки потомству [2].

Недавно было обнаружено, что эффективность неvirемической трансмиссии ВКЭ Сибирского субтипа между клещами *I. ricinus* чрезвычайно низкая — при совместном питании с зараженными самками заражались только от 0 до 5 % нимф, в то время как для ВКЭ Западноевропейского субтипа этот показатель составлял 60—100 % (Т.С. Gritsun и М. Labuda, неопубл.). В настоящей работе мы попытались определить, какие вирусные белки определяют эффективность неvirемической трансмиссии. Для этого мы сконструировали ряд рекомбинантных вирусов, содержащих разные комбинации генов ВКЭ Сибирского и Западноевропейского субтипов, и сравнили их биологические свойства со свойствами соответствующих типовых штаммов обоих субтипов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для культивации ВКЭ, титрования инфекционного вируса с помощью бляшкообразующих единиц, восстановления рекомбинантных вирусов и оценки эффективности репродукции вирусов в клетках млекопитающих использовали культуру клеток эмбриона свиньи СПЭВ. Все эксперименты проводили с использованием среды RPMI1640 с добавлением 2—5 % сыворотки крови эмбрионов коров и антибиотиков.

Типовые штаммы ВКЭ «Нург» и «Васильченко» были получены из коллекции Центра экологии и гидрологии «Оксфорд» [8]. Рекомбинантные вирусы конструировали с помощью методики инфекционного клонирования полноразмерных ДНК-копий геномов ВКЭ в плазмидных векторах pBR322 с использованием ряда промежуточных субклонов, содержащих отдельные гены ВКЭ, как описано ранее [4].

Концентрацию инфекционного вируса, а также морфологию бляшек определяли с помощью титрования бляшкообразующих единиц (БОЕ/мл) согласно Gould и Clegg, 1985 [3]. Эффективность репликации ВКЭ в культуре клеток млекопитающих оценивали по скорости накопления инфекционного вируса в течение первых 48 часов после

заражения. Монослой клеток заражали из расчета 1 БОЕ на клетку, адсорбировали вирус в течение 1 часа при комнатной температуре, тщательно промывали монослой и заливали среду поддержки. Через 4, 8, 12, 16, 20, 24 и 48 часов отбирали аликвоты надклеточной среды и определяли титр инфекционного вируса.

Клещи *I. ricinus* были выведены в лабораторной колонии Института Зоологии Академии наук Словакии (Братислава). Эффективность неvirемической трансмиссии для каждого вируса определяли следующим образом. Группу из 10 голодных самок клещей заражали инъекцией 500 БОЕ исследуемого вируса на одного клеща. Зараженных клещей инкубировали при $24 \pm 4^\circ\text{C}$ и влажности 85—90 % в течение 14 дней. Далее зараженных самок попарно прокармливали на мышах Balb/C одновременно с 15 неинфицированными нимфами *I. ricinus*, которые были прикреплены в непосредственной близости от самок-доноров. Открепившихся нимф и самок использовали для определения в них концентрации инфекционного вируса. Эффективность трансмиссии определяли как долю зараженных нимф. Эффективность репликации оценивали по средней концентрации инфекционного вируса в единичном зараженном клеще.

Все биологические эксперименты проводили как минимум в 3 независимых повторах. Для оценки вариабельности результатов рассчитывали стандартную ошибку средних значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выяснения роли отдельных белков ВКЭ в процессе неvirемической трансмиссии нами были сконструированы следующие рекомбинантные вирусы: Нург[*str*]Vs[*ns*] — 5'UTR и гены белков С, ргМ и Е взяты от типового штамма «Нург», а гены неструктурных белков и 3'UTR — от штамма «Васильченко»; Vs [Нург ргМ-Е] — гены белков ргМ и Е взяты от типового штамма «Нург», а 5'UTR, гены белков С и неструктурных белков и 3'UTR от штамма «Васильченко»; Vs [Нург Е] — ген белка Е взят от штамма «Нург», а остальной геном — от штамма «Васильченко». Таким образом, в ВКЭ «Васильченко», обладающего 5 % эффективностью неvirемической трансмиссии, были в разной пропорции введены гены структурных белков ВКЭ «Нург», обладающего 70 % эффективностью.

При оценке эффективности репродукции рекомбинантных ВКЭ и типовых штаммов в клетках млекопитающих выяснилось, что все они способны достигать высоких титров в культуре клеток СПЭВ. Динамика репродукции вирусов оказалась практически идентичной и к 32 часу после момента заражения титры вирусов достоверно не отличались друг от друга (рис. 1).

Во взрослых клещах *I. ricinus* все вирусы размножались со сходной эффективностью и достигали титров $3,65 - 5,71 \log_{10}$ БОЕ/мл. Интересно, что типовые штаммы размножались с практически одинаковой эффективностью — $4,56 \log_{10}$ БОЕ/мл для

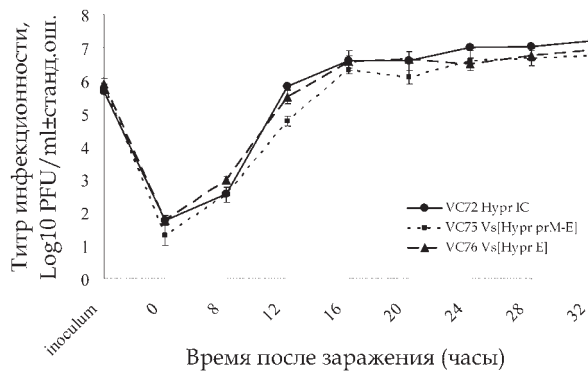


Рис. 1. Динамика репродукции рекомбинантных вирусов в культуре клеток млекопитающих (СПЭВ).

«Васильченко» и $4,54 \log_{10}$ БОЕ/мл для «Нург». При этом не обнаружено ни существенных различий в титрах типовых штаммов и химерных вирусов, ни корреляции между титрами вируса и композицией его структурных белков.

В нимфах *I. ricinus* штамм «Нург» размножался существенно лучше, чем «Васильченко». При этом, по мере введения структурных генов «Нург» в геном «Васильченко», эффективность репродукции вируса росла, была полностью восстановлена до значений штамма «Нург» при композиции Vs [Нург prM-E] и достигала максимума при композиции Hypr[str]Vs[ns] (рис. 2А).

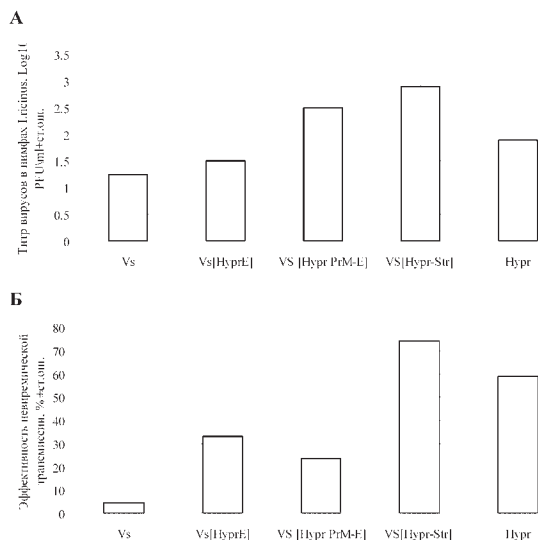


Рис. 2. А – репродукция рекомбинантных и исходных вирусов в нимфах *I. ricinus*; Б – эффективность невинермической трансмиссии рекомбинантных и исходных вирусов от самок к нимфам *I. ricinus*.

Эффективность невинермической трансмиссии от самок к нимфам также ясно коррелировала с композицией структурных белков ВКЭ. Так, замена гена белка Е в геноме «Васильченко» на ген Е штамма «Нург» привела к увеличению эффективности трансмиссии с $4,5 \pm 2,78\%$ до $33,16 \pm 10,44\%$. Наибольшая эффективность трансмиссии была характерна для рекомбинантного вируса Hypr[str]

Vs[ns], что согласуется с высокой эффективностью репродукции этого вируса в нимфах (рис. 2Б).

Таким образом, полученные результаты показывают, что эффективность невинермической трансмиссии ВКЭ целиком и полностью зависит от комплекса структурных белков, каждый из которых вносит существенный вклад в этот процесс. Действительно, введение одного (Е) или даже двух (prM-E) генов штамма «Нург» в геном «Васильченко» привело только к частичному восстановлению способности к невинермической трансмиссии между клещами *I. ricinus*, несмотря на то, что полностью восстановило способность вируса размножаться в нимфах *I. ricinus*.

Необходимо отметить, что наибольшую эффективность трансмиссии показал рекомбинантный вирус Hypr[str]Vs[ns], который помимо генов структурных белков содержал также нетранслируемый регион 5'UTR вируса «Нург». Поскольку ни один рекомбинантный вирус с заменой индивидуальных генов структурных белков не восстановил способность к невинермической трансмиссии до сравнимых значений, роль 5'UTR и ансамбля структурных белков в этом процессе требует более глубокого изучения.

Данная работа выполнена при поддержке грантов BBSRC BBS/B/00697, The Sixth EU Framework grant (VIZIER EU Contract LSHG-CT-2004-511960) и грантом MRC ID 87652. Данный проект вдохновлен идеями покойного проф. Milan Labuda, который сформулировал концепцию невинермической трансмиссии ВКЭ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов В.А., Малов И.В., Ющук Н.Д. Клещевой энцефалит. Новосибирск, «Наука», 2002. — 183 с.
2. Danielova V., Holubova J. Transovarial transmission rates of tick-borne encephalitis virus in Ixodes ricinus ticks. In: Dusbabek F, Bukva V, eds. Modern acarology. Vol 2, Prague, Czech Republic: SPB Academic Publishing; 1991. — С. 7–10.
3. Gould E.A., Clegg J.C.S. Growth, titration and purification of togaviruses. // In: B. W. J. Mahy (ed.), Virology: A Practical Approach. — IRL Press, 1985. — P. 43–48.
4. Gritsun TS, Gould EA Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy // J. Virol. Methods. — Vol. 76. — P. 109–120.
5. Kunz C., Heinz F.X. Tick-borne encephalitis. — Vaccine, 2003. — Vol. 21. — P. 1–2.
6. Lindquist L., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis // Lancet. — 2008. — Vol. 371. — P. 1861–1871.
7. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature / M. Labuda [et al.] // Experientia. — 1993. — Vol. 49. — P. 802–805.
8. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope gene of the Vasilchenko strain of TBE virus; comparison with other flaviviruses / T.S. Gritsun [et al.] // Virus Res 27. — 1993. — P. 201–209.

9. Rice C. Flaviviridae: the viruses and their replication // In: Fields, B., Knipe, M.D. (Eds.), Fields Virology. — Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia and New York, 1996.

Сведения об авторах

Хаснатинов Максим Анатольевич – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; тел. (3952)333-971)

Havlikova S. – Institute of Virology, Bratislava

Tuplin A. – лектор School of Life Sciences, University of Warwick

Kazimirova M. – научный сотрудник Institute of Zoology, Slovakia

Goonavardane N. – научный сотрудник School of Biological Sciences, University of Reading, UK

Slovak M. – научный сотрудник Institute of Zoology, Slovakia

Klempa B. – руководитель группы экологии вирусов Institute of Virology, Bratislava

Jones I. M. – глава департамента School of Biological Sciences, University of Reading, UK

Labuda M. – профессор Institute of Virology, Bratislava

Gould E.A. – профессор Unit des Virus Emergents, Marseille, France

Gritsun T.S. – лектор School of Biological Sciences, University of Reading, UK